

## Karakterisasi Enzim Nitril Hidratase dan Amidase dari *Pseudomonas* sp. BP3 dalam Biokonversi Adiponitril menjadi Asam Adipat

Bambang Sunarko & Nunik Sulistinah

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Jl Raya Bogor Jakarta Km 46, Cibinong

Email: bsunbiol@gmail.com

### ABSTRACT

**Characterization of Nitrile Hydratase and Amidase of *Pseudomonas* sp BP3 in Bioconversion of Adiponitrile to Adipic Acid.** Adipic acid is a commercially important compound, primarily used as precursor for the production of nylon 6.6. It is also used for plasticizer, fibers, and food additive. Synthesis of adipic acid by chemical means requires large amount of energy and concentrated acid. It also produces  $N_2O$  as by product, which is very toxic and suspected causes depletion of the ozone layer. The purpose of this research was to study the bioconversion of adiponitrile by *Pseudomonas* sp. BP3 and to characterize the involved enzymes in the whole cell. *Pseudomonas* sp. BP3 was able to utilize adiponitrile as the sole source of carbon and nitrogen. It's doubling time ( $t_d$ ) and growth rate constant ( $\mu$ ) during the growth in adiponitrile were 2 hours and 0.346/h, respectively. The optimum pH and temperature of nitrile-hydratase were pH 7.0 and 30°C, respectively, while those of amidase were pH 6 and 50°C.  $V_{max}$  and  $K_s$  of nitrile hydratase were 8.3 nM/ml.min. and 55.56 mM, respectively, and of amidase were 5.9 nM/ml.min and 50 mM. The rate of adiponitrile consumption was 0.245 mM/h and of adipic acid formation was 0.181 mM/h. The yield of bioconversion of adiponitrile and adipamide were about 50 % and 25%, respectively.

**Key words:** Bioconversion, adiponitrile, adipic acid, *Pseudomonas* sp. BP3, nitrile hydratase, amidase

### PENDAHULUAN

Asam adipat,  $HOOC(CH_2)_4COOH$ , merupakan senyawa penting secara komersial. Dalam industri, asam adipat digunakan terutama sebagai bahan baku untuk produksi nilon 6,6. Selain itu, senyawa tersebut juga digunakan sebagai *plasticizers*, serat, dan aditif makanan. Selama ini, asam adipat diproduksi secara kimiawi, terutama melalui oksidasi sikloheksana. Namun proses ini, selain

memerlukan konsentrasi asam dan energi yang tinggi, juga menghasilkan produk samping  $N_2O$ , yang dicurigai bertanggung-jawab atas kerusakan lapisan ozon dan pemanasan global (ICCP 2001).

Sebagai alternatif, asam adipat secara prinsip dapat juga dihasilkan melalui proses biokonversi, yang melibatkan mikrob penghasil enzim sebagai biokatalis. Hal ini dilandaskan pada banyak laporan yang menunjukkan

bahwa beberapa mikroba mampu menghidrolisis senyawa nitril menjadi asam karboksilat. *Mycobacterium imperiale* CBS-74, misalnya, dilaporkan mampu memproduksi asam nikotinat, senyawa pemula Vitamin B<sub>3</sub> (Cantarella *et al.* 2008). Asam-asam amino juga dapat diproduksi melalui hidrolisis beragam senyawa nitril oleh *Rhodococcus* sp. AJ270 (Wang *et al.* 2005). Demikian pula, asam akrilat dapat diproduksi melalui hidrolisis akrilonitril oleh *Rhodococcus* spp. (Hughes *et al.* 1998).

Sampai saat ini, dikenal dua macam lintasan reaksi hidrolisis senyawa nitril secara enzimatis. Lintasan reaksi pertama melibatkan dua enzim, yaitu nitril-hidratase (E.C.4.3.2.84) dan amidase (E.C.3.5.1.4). Enzim nitril-hidratase menghidrolisis nitril menjadi amida, sedangkan amidase menghidrolisis amida menjadi asam karboksilat (Drauz & Waldmann 1995). Lintasan reaksi kedua melibatkan hanya satu macam enzim, yaitu nitrilase (E.C.3.5.5.1), yang menghidrolisis nitril menjadi asam karboksilat, tanpa menghasilkan amida sebagai produk antara (Drauz & Waldmann 1995).

Sampai saat ini, masih sangat sedikit penelitian yang mengungkap kemampuan mikroba menghidrolisis adiponitril dan pemanfaatannya untuk memproduksi asam adipat. Hanya Bengis-Garber & Arie (1989), Moreau *et al.* (1993ab) dan Dhillon & Shivaraman (1999) yang pernah melaporkan bahwa *Rhodococcus rhodochrous* N.C.I.B. 11216 dan *Brevibacterium* sp. mampu menghidrolisis adiponitril dengan menghasilkan

asam adipat. Dengan demikian, penelitian untuk mengungkap kemungkinan adanya mikroba lain yang mampu mendegradasi adiponitril masih layak untuk dilakukan.

Dari hasil penelitian sebelumnya, *Pseudomonas* sp. BP3 terbukti mampu mendegradasi asetonitril, dengan menghasilkan asetamida dan asam asetat sebagai produk degradasinya (Sunarko *et al.* 2005). Ini mengindikasikan, bahwa *Pseudomonas* sp. BP3 mampu mensintesis enzim nitril-hidratase dan amidase, yang kemungkinan dapat juga menghidrolisis adiponitril. Penelitian ini bertujuan untuk menguji lebih lanjut hipotesis ini. Penelitian mencakup pengujian kemampuan tumbuh *Pseudomonas* sp. BP3 dalam adiponitril, penentuan pola degradasi dan biosintesis enzim yang terlibat didalamnya (nitril hidratase, amidase) serta menentukan beberapa karakteristik enzim-enzim tersebut. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat digunakan sebagai landasan untuk produksi asam adipat dalam skala yang lebih besar.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Mikroorganisme.

*Pseudomonas* sp BP3, yang digunakan dalam penelitian ini, diisolasi dari limbah pabrik cat dan saat ini disimpan di koleksi kultur Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI.

### Media kultivasi *Pseudomonas* sp. BP3

Media yang digunakan untuk menumbuhkan *Pseudomonas* sp BP3 adalah media mineral (Meyer & Schlegel

1983; Pfennig 1974) yang ditambah dengan 40 mM adiponitril, sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen.

#### **Kultivasi *Pseudomonas* sp. BP3**

Kultivasi *Pseudomonas* sp. BP3 dilakukan dalam bejana Erlenmeyer (2 liter) berisi 800 ml media tumbuh. Kultur diinkubasi di atas mesin pengocok (*shaker*) pada suhu kamar ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ). Dalam interval waktu 3 jam, contoh diambil untuk penentuan pola pertumbuhan, perubahan pH, aktivitas enzim, kadar protein, konsumsi adiponitril, konsentrasi  $\text{NH}_4^+$ , dan asam adipat.

#### **Produksi biomassa sel *Pseudomonas* sp. BP3**

Biomassa diproduksi dalam bejana Erlenmeyer (3 liter) berisi 1,5 liter media tumbuh yang mengandung 40 mM adiponitril. Kultur diinkubasi pada suhu kamar ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ). Sel dipanen dengan sentrifuse (10.000 rpm) pada suhu  $4^\circ\text{C}$ , selama 15 menit. Pelet yang diperoleh dicuci 2 kali dengan bufer fosfat (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2). Pelet digunakan untuk penentuan aktivitas dan karakteristik enzim dalam sel utuh (*whole cells*).

#### **Aktivitas enzim nitrilhidratase dan amidase (Sunarko 1995)**

Aktivitas nitrilhidratase dalam sel utuh ditentukan dengan menambahkan 1,5% (b/v) sel ke dalam bufer fosfat, berisi 100 mM adiponitril. Campuran reaksi kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ). Aktivitas enzim dihentikan dengan penambahan 0,20 ml 4N HCl, disentrifuse

dan kemudian kadar  $\text{NH}_4^+$  dalam supernatan ditentukan. Aktivitas amidase ditentukan dengan cara yang sama, namun dengan mengganti substrat dengan 100 mM adipamida. Satu unit aktivitas enzim (U) setara dengan 1 mmol adiponitril atau adipamida yang terhidrolisis dalam waktu satu menit per mg sel. Aktivitas total merupakan aktivitas enzim per satuan volume, sedangkan aktivitas spesifik merupakan aktivitas enzim per satuan bobot protein (Thontowi *et al.* 2004)

#### **Suhu dan pH optimum aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase**

Pengaruh suhu terhadap aktivitas nitrilhidratase dan amidase ditentukan dengan menambahkan 1,5% (b/v) sel ke dalam 10 ml bufer fosfat yang mengandung substrat (100 mM adiponitril atau 100 mM adipamida). Larutan kemudian diinkubasi pada kisaran suhu  $5^\circ\text{C}$  -  $60^\circ\text{C}$  dalam bejana tertutup. Aktivitas enzim ditentukan dengan cara seperti yang telah diuraikan sebelumnya. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim ditentukan dengan cara yang sama seperti pada penentuan suhu, namun larutan reaksi diinkubasi pada kisaran pH 4-10 pada suhu optimum.

#### **$V_{\text{maks}}$ dan $K_s$ enzim nitrilhidratase dan amidase**

Sebanyak 1,5% sel b/v ditambahkan ke dalam bufer fosfat pada suhu kamar ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ). Substrat (adiponitril atau adipamida) kemudian ditambahkan dengan konsentrasi 0-120 mM. Aktivitas enzim ditentukan dengan cara yang telah disebutkan.

### **Biokonversi adiponitril dengan sel *Pseudomonas* sp. BP3**

Sebanyak 1,5% (b/v) sel ditambahkan ke dalam bufer fosfat, berisi 100 mM adiponitril. Larutan kemudian diinkubasi di atas mesin pengocok, pada suhu kamar ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ). Dalam interval waktu tertentu, contoh diambil dan kandungan  $\text{NH}_4^+$  ditentukan.

### **Konsentrasi adiponitril dan asam adipat**

Konsentrasi adiponitril, dan asam adipat ditentukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Thontowi *et al.* 2004), dengan kondisi: fase gerak metanol 80%, fase diam kolom organik C18 10 $\mu$ , detektor UV ( $\lambda$  354). Sebelum diinjeksikan ke dalam KCKT, supernatan (hasil fermentasi dan biotransformasi) dilarutkan dalam metanol. Konsentrasi adiponitril dan asam adipat ditentukan dengan membandingkan kurva yang didapat dengan kurva dari larutan standar adiponitril atau asam adipat.

### **Konsentrasi amonium**

Konsentrasi amonium ditentukan secara kolorimetris dengan menggunakan metode Nessler (Gerhardt *et al.* 1994). Supernatan sampel (0,1 ml) ditambahkan ke dalam 9,9 ml 0,1 N NaOH. Kemudian ke dalam larutan tersebut ditambahkan 0,2 ml pereaksi Nessler yang dihomogenkan dan diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya campuran diukur pada panjang gelombang 400 nm. Konsentrasi amonium dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar.

## **HASIL**

### **Pertumbuhan *Pseudomonas* dan biosintesis enzim nitril hidratase dan amidase**

Pola pertumbuhan *Pseudomonas* sp. BP3, perubahan pH, konsentrasi substrat (adiponitril) dan produk degradasi (asam adipat dan amonia) selama pertumbuhan dalam 10 mM adiponitril ditampilkan pada Gambar 1. Sedangkan, aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase selama pertumbuhan *Pseudomonas* sp. BP3 ditampilkan pada Gambar 2. *Pseudomonas* sp. BP3 mampu tumbuh dengan fase lag  $\pm 6$  jam. Dari hasil perhitungan, waktu penggandaan ( $t_d$ ) dan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) bakteri tersebut masing-masing sebesar 2 jam dan 0,346/jam.

Selama pertumbuhan, konsentrasi substrat (adiponitril) terus menurun, sedangkan konsentrasi asam adipat dan amonia cenderung meningkat. Dari hasil perhitungan, laju rata-rata penurunan substrat (adiponitril) sebesar 0,245 mM/jam, sedangkan laju rata-rata kenaikan asam adipat dan amonia masing-masing sebesar 0,181 mM/jam dan 0,676 mM/jam. Konsentrasi tertinggi asam adipat (9,49 mM) dan  $\text{NH}_4^+$  (34,26 mM) dicapai pada akhir fase logaritmik. Selain itu, pH medium juga cenderung meningkat selama pertumbuhan, dengan kisaran antara pH 7,8 -8,3.

Dari Gambar 2A tampak, aktivitas total enzim nitril hidratase dan amidase juga cenderung meningkat selama pertumbuhan. Aktivitas tertinggi kedua enzim dicapai pada akhir fase log pertumbuhan, yaitu masing-masing

sebesar 1,19 U dan 4,23 U. Sedangkan dari Gambar 2B tampak bahwa aktivitas spesifik nitril hidratase dan amidase mempunyai pola yang berbeda. Aktivitas amidase tertinggi dicapai pada 20 jam pertama kemudian menurun secara tajam, sedangkan aktivitas nitril hidratase cenderung stabil selama pertumbuhan.

### Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase dalam sel utuh

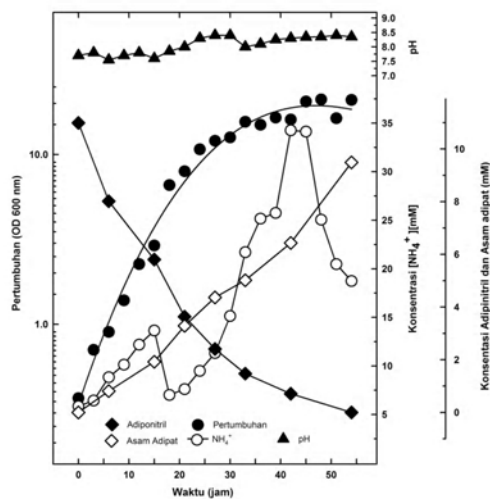
Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase dalam sel utuh ditampilkan pada Gambar 3A, sedangkan pengaruh suhu ditampilkan pada Gambar 3B. Terlihat bahwa aktivitas tertinggi enzim nitril hidratase terlihat pada pH 7 dan amidase pada pH 6. Sedangkan, suhu optimum untuk nitril hidratase berada pada kisaran suhu 25°C-30°C, dan untuk amidase pada 50°C.

### $K_s$ dan $V_{maks}$ nitril hidratase dan amidase

Gambar 4A dan 4B menunjukkan bahwa aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase (dalam sel utuh) mengikuti pola Michaelis-Menten. Dengan menggunakan persamaan Line-Weaver Burk (Gambar 4C dan 4D), nilai  $V_{maks}$  dan  $K_s$  enzim nitril hidratase dapat ditentukan masing masing sebesar 8,3 nM/min.ml dan 55,56 mM, sedangkan untuk enzim amidase masing masing sebesar 5,9 nM/ml.min dan 50 mM.

### Biokonversi adiponitril dan adipamida dengan sel utuh.

Pola pembentukan produk degradasi ( $\text{NH}_4^+$ ) dari proses biokonversi adiponitril dan adipamida ditampilkan dalam Gambar 5A, sedangkan laju dari proses biokonversi tersebut pada Gambar 5B. Seperti terlihat dalam gambar, Selama 180 menit, biokonversi adiponitril



**Gambar 1:** Pola pertumbuhan *Pseudomonas* sp. BP3 dalam 100 mM adiponitril.

menghasilkan 108 mM  $\text{NH}_4^+$  dengan laju tertinggi sebesar 2,21 mM/ml.min., sedangkan biokonversi adipamida menghasilkan 26,64 mM  $\text{NH}_4^+$  dengan laju sebesar 4,05 mM/ml.min.

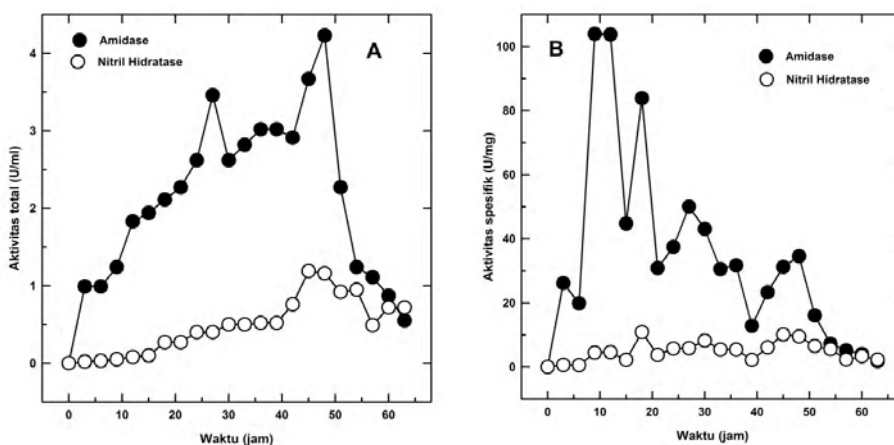
## PEMBAHASAN

Sampai saat ini, telah banyak laporan tentang kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa nitril, baik alifatik maupun aromatik (Layh *et al.* 1997; Sugai *et al.* 1997; Johnson *et al.* 2000; Mart'ýnkov'a & Mylerov'a 2003), namun belum banyak laporan tentang kemampuan bakteri dalam mendegradasi adiponitril, yaitu senyawa nitril dengan dinitril, sebagai gugus fungsionalnya (Moreau *et al.* 1993ab; Munandar 2002; Fitri 2005; Thontowi *et al.* 2004).

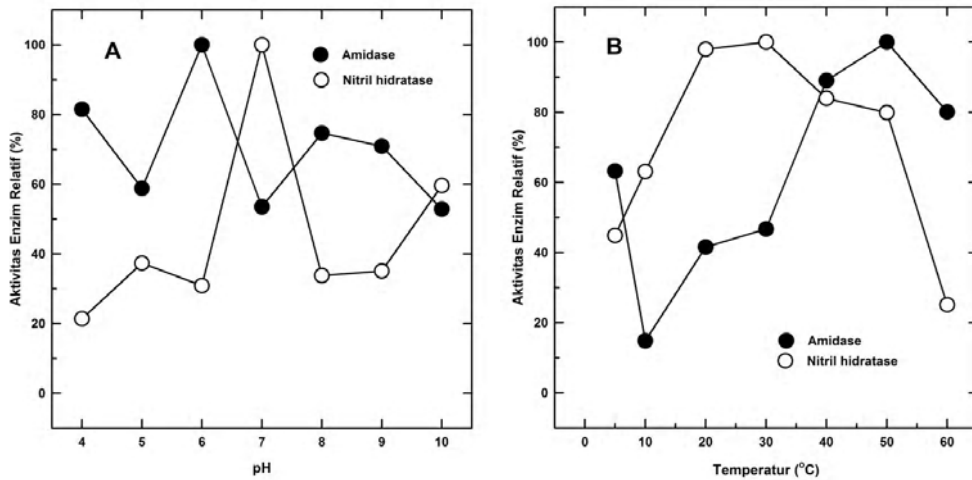
Dalam penelitian ini dapat dibuktikan bahwa *Pseudomonas* sp. BP3 mampu tumbuh pada adiponitril dengan laju

pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) 0,346/jam dan waktu penggandaan ( $t_d$ ) 2 jam (Gambar 1). Ini berarti, isolat tersebut dapat memanfaatkan adiponitril sebagai satu-satunya sumber karbon, energi, dan nitrogen untuk tumbuhnya. Isolat bakteri NUB1 dilaporkan juga mampu tumbuh pada adiponitril (Munandar 2002). Namun, *Pseudomonas* sp. BP3 tampaknya lebih mampu beradaptasi terhadap adiponitril dibandingkan isolat NUB1. Dalam substrat yang sama, *Pseudomonas* sp. BP3 tumbuh dengan fase lag  $\pm$  6 jam, sedangkan isolat NUB1 selama  $\pm$  200 jam.

Kemampuan tumbuh *Pseudomonas* sp. BP3 pada adiponitril, secara tidak langsung, juga mengindikasikan bahwa isolat tersebut mampu mensintesis enzim pendegradasi adiponitril. Penurunan substrat (adiponitril), dan terjadinya akumulasi asam adipat dan amonia ( $\text{NH}_4^+$ ) selama pertumbuhan (Gambar 1), memperkuat dugaan adanya proses



**Gambar 2.** Aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase dari sel *Pseudomonas* sp. BP3 selama pertumbuhan. Aktivitas total (A) dan aktivitas spesifik (B).



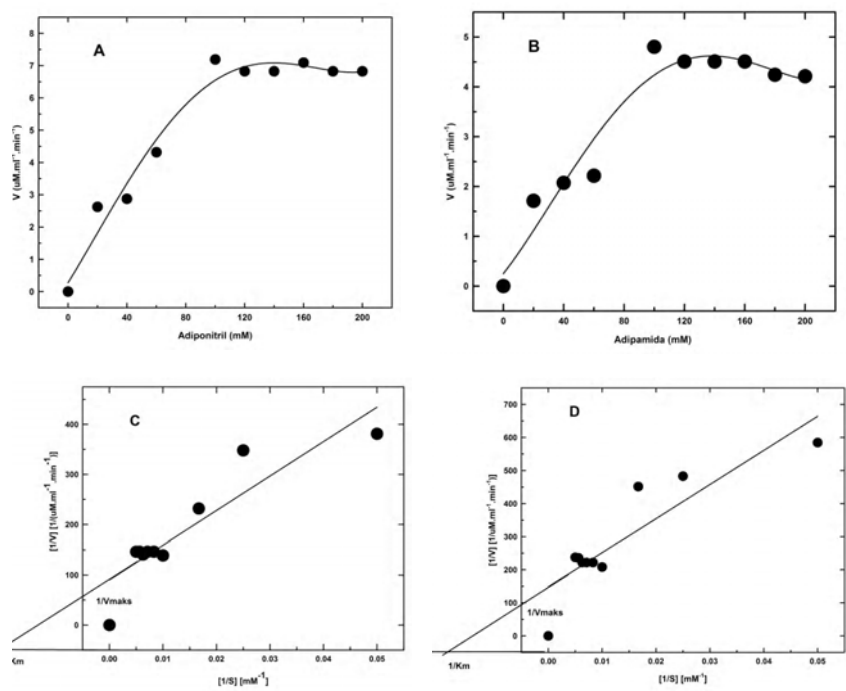
**Gambar 3.** Pengaruh pH (A) dan suhu (B) terhadap aktivitas nitril hidratase dan amidase dari sel *Pseudomonas* sp. BP3

degradasi adiponitril oleh aktivitas enzim tersebut. Secara umum, biokonversi senyawa nitril dilaporkan melibatkan dua alur reaksi yang menghasilkan asam-karboksilat dan  $\text{NH}_4^+$ , sebagai produk akhirnya (Nagasawa *et al.* 1987; Wyatt & Linton 1988; Sander 1991; Sunarko 1995). Alur reaksi pertama melibatkan enzim nitril hidratase (E.C. 4.3.2.84) dan amidase (E.C. 3.5.1.4), sedangkan alur reaksi kedua melibatkan enzim nitrilase (E.C.3.5.5.1).

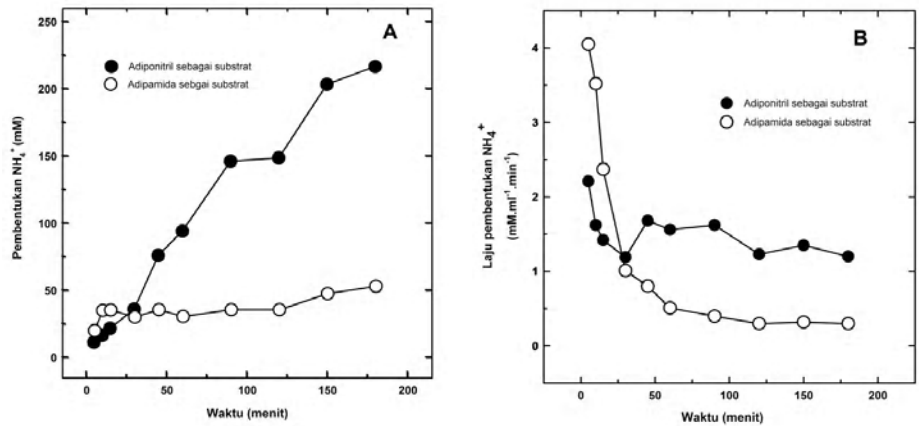
Degradasi adiponitril oleh *Pseudomonas* sp. BP3 selama pertumbuhan tampaknya melewati alur yang melibatkan nitril hidratase dan amidase, dan bukan melalui alur yang melibatkan nitrilase. Ini terbukti dari keberadaan enzim nitril hidratase dan amidase selama pertumbuhan (Gambar 2). Banyak laporan menunjukkan, bahwa degradasi senyawa nitril alifatik

cenderung melibatkan nitril-hidratase dan amidase, sedangkan degradasi nitril aromatik cenderung hanya melibatkan enzim nitrilase saja (Kobayashi *et al.* 1997; Nagasawa *et al.* 1988; DiGeronimo & Antoine 1976; Asano *et al.* 1980; Briglia *et al.* 1996).

Biosintesis enzim nitril hidratase dan amidase dalam sel *Pseudomonas* sp. BP3 terjadi dalam fase eksponensial pertumbuhan. Ini diindikasikan oleh aktivitas total kedua enzim tersebut, yang mencapai puncaknya di awal fase stasioner (Gambar 2). Kecenderungan ini bisa dipahami, karena kedua enzim termasuk dalam kelompok enzim metabolik, yang berperan sebagai pemasok sumber energi dan karbon untuk pertumbuhan. Hasil ini memperkuat pengamatan Wu & Li (2002) yang menunjukkan bahwa enzim pentransformasi senyawa nitril biasanya terbentuk secara optimum pada fase log.



Gambar 4: Kurva Michaelis Menten dan Line-Weaver Burk dari aktivitas nitril- hidratase (A, C) dan amidase (B, D).



Gambar 5: Pola (A) dan laju (B) pembentukan produk ( $\text{NH}_4^+$ ) biotransformasi adiponitril dan adipamida dengan sel *Pseudomonas* sp. BP3



Selama pertumbuhan, *Pseudomonas* sp. BP3 mensintesis enzim amidase jauh lebih tinggi ( $\pm 4$  kali) dibandingkan dengan nitril hidratase (Gambar 2). Kecenderungan ini juga terlihat pada laju transformasi substrat yang dihasilkan sel *Pseudomonas* sp. BP3 (Gambar 5A & 5B). Laju transformasi maksimum dengan substrat adipamida (amidase) sekitar dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan substrat adiponitril (nitril hidratase). Sejauh ini belum ada penjelasan yang cukup memuaskan terkait dengan fenomena tersebut, namun banyak laporan yang menunjukkan kecenderungan yang sama (DiGeronimo *et al.* 1976; Asano *et al.* 1980; Nagasawa *et al.* 1988; Briglia *et al.* 1996).

Sebaliknya, aktivitas nitril hidratase, yang terbentuk selama pertumbuhan, tampak relatif lebih stabil dibandingkan dengan aktivitas amidase. Ini diindikasikan oleh pola aktivitas spesifik kedua enzim tersebut (Gambar 2). Pola laju transformasi yang ditampilkan pada Gambar 5A dan 5B juga memperkuat hasil pengamatan ini. Laju transformasi adiponitril (aktivitas nitril-hidratase) relatif stabil selama inkubasi, sedangkan laju transformasi adipamida (amidase) tertinggi hanya terjadi di awal reaksi, kemudian menurun secara drastis. Ketidakstabilan aktivitas amidase ada kemungkinan terkait dengan perubahan kondisi media pertumbuhan, terutama penurunan konsentrasi substrat (adiponitril), akumulasi produk degradasi (asam adipat dan amonia), dan juga perubahan pH. Namun sejauh ini belum diketahui secara pasti peranan ketiga faktor tersebut sebagai aktivator atau

inhibitor terhadap aktivitas enzim amidase.

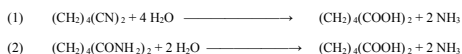
pH optimum aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase dari *Pseudomonas* sp. BP3 diketahui berada pada pH netral, yaitu masing-masing pada pH 7 dan pH 6 (Gambar 3A). Aktivitas nitril hidratase dari beberapa mikroba dilaporkan juga mempunyai pH optimum dalam kisaran pH 6.0 - pH 7.0, antara lain *Agrobacterium tumefaciens* d3 (Bauer *et al.* 1994) dan *Bacillus* sp. (Pereira *et al.* 1998). Sedangkan, pH optimum amidase pada kisaran yang sama, antara lain ditunjukkan oleh *Arthrobacter* sp. J1 (Asano *et al.* 1982); *Klebsiella pneumoniae* NCTR1 (Nawaz *et al.* 1994; *Bacillus stearothermophilus* BR388 (Cheong & Oriel 2000); *Rhodococcus rhodochrous* M8 (Kotlova *et al.* 1999).

Suhu optimum nitril hidratase dan amidase dari *Pseudomonas* sp. BP3 menunjukkan perbedaan yang cukup mencolok (Gambar 3B). Nitril hidratase paling aktif pada suhu 25°C-30°C, sedangkan amidase cenderung bersifat mesofilik, aktivitas tertinggi terjadi pada suhu 50°C. Enzim nitril hidratase dari *Rhodococcus* sp. N 771 (Yamada & Kobayashi 1996); dan *Brevibacterium* sp. R 312 (Nagasawa *et al.* 1986) dilaporkan juga mempunyai suhu optimum 25°C - 30°C. Disamping itu, dilaporkan banyak mikroba yang menghasilkan enzim amidase yang mempunyai suhu optimum yang tinggi, antara lain *Klebsiella pneumoniae* NCTR1 (65°C) (Nawaz *et al.* 1994; *Pseudomonas chlororaphis* B23 (50°C) (Ciskainik *et al.* 1995); *Ochrobactrum anthropi* SV3 (45°C)

(Komeda & Asano 2000); *Bacillus stearothermophilus* BR388 (55°C) (Cheong & Oriel 2000); *Rhodococcus* sp. (40°C) (Nawaz *et al.* 1994); *Rhodococcus erythropolis* MP50 (55°C) (Hirrlinger *et al.* 1996); *Rhodococcus rhodochrous* M8 (55°C-60°C) (Kotlova *et al.* 1999)

Ks enzim nitril hidratase dan amidase dalam sel *Pseudomonas* sp. BP3 tidak terlalu jauh berbeda, yaitu masing-masing sebesar 55,56 mM dan 50 mM (Gambar 4). Sedangkan  $V_{maks}$  nitril-hidratase (8,3 nM/ml.min) relatif lebih tinggi dibandingkan dengan amidase (5,9 nM/ml.min). Sebagai pembanding, amidase murni dari sel *Pseudomonas chlororaphis* B23 memiliki  $K_m$  0,25 mM dan  $V_{maks}$  11,7  $\mu$ mol/min/mg dengan menggunakan substrat propionamida (Ciskanic *et al.* 1995), sedangkan  $K_m$  dan  $V_{maks}$  amidase dari strain mutan *Brevibacterium* sp masing-masing sebesar 11 mM dan 7,5 U/mg protein dengan substrat adipamida (Moreau *et al.* 1993ab).

Selama 180 menit, biokonversi 100 mM adiponitril menghasilkan 108 mM  $NH_4^+$ , sedangkan biokonversi 100 mM adipamida menghasilkan 26,64 mM  $NH_4^+$  (Gambar 5) Secara stoikiometris, degradasi adiponitril (1) dan adipamida (2) dapat dipaparkan sebagai berikut:



Ini berarti, efisiensi (rendemen) dari proses biokonversi adiponitril dengan sel *Pseudomonas* sp. BP3 adalah sebesar  $\pm 50\%$ , sedangkan bila adipamida digunakan sebagai substrat,

rendemennya hanya sebesar  $\pm 25 \%$ . Walaupun demikian, rendemen yang diperoleh jauh lebih tinggi, bila dibandingkan dengan proses biokonversi menggunakan isolat bakteri BA2. Dengan substrat dan waktu inkubasi yang sama dihasilkan 4,44 mM  $NH_4^+$ , yang berarti setara dengan rendemen sebesar  $< 2,5 \%$ .

## KESIMPULAN

*Pseudomonas* sp. BP3 mampu tumbuh dan memanfaatkan adiponitril sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen dengan waktu penggandaan ( $t_d$ ) selama 2 jam dan konstanta laju pertumbuhan ( $\mu$ ) sebesar 0,316 jam<sup>-1</sup>. Proses degradasi adiponitril melibatkan enzim nitril-hidratase dan amidase, dengan produk asam adipat dan amonia. Laju konsumsi adiponitril dan pembentukan asam adipat masing-masing sebesar 0,245 mM/jam dan 0,181 mM/jam.

Nilai pH optimum untuk nitril hidratase dan amidase masing-masing adalah pH 7 dan 6, dan suhu optimum masing-masing adalah 27 °C dan 50 °C. Nilai  $K_s$  dan  $V_{maks}$  nitril hidratase berturut-turut sebesar 55,56 mM dan 8,3 nM/ml.min, sedangkan  $K_s$  dan  $V_{maks}$  amidase masing-masing sebesar 50 mM dan 5,9 nM/ml.min.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada sdri. Eva Yuliana Fitri atas keterlibatannya dalam pelaksanaan eksperimen. Penelitian ini memperoleh dukungan biaya dari APBN tahun anggaran 2006.

## DAFTAR PUSTAKA

- Asano, Y., Y. Tani & H. Yamada. 1980. A new enzyme "nitrile hydratase" which degrades acetonitrile in combination with amidase. *Agric. Biol Chem* 44(9): 2251-2252.
- Asano, Y., M. Tashibana, Y. Tani & H. Yamada. 1982. Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter* sp. J1: purification and characterization. *Agric Biol Chem* 46:1165-1174
- Banerjee, A., R. Sharma & UC. Banerjee. 2002. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:33-44
- Bauer, R., B. Hirrlinger, N. Layh, A. Stolz & HJ. Knackmuss. 1994. Enantioselective hydrolysis of racemic 2-phenylpropionitrile and other (R, S)-2-arylpropionitriles by a new bacterial isolate, *Agrobacterium tumefaciens* strain d3. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:1-7
- Bengis-Garber, C. & LG. Arie. 1989. Selective hydrolysis of dinitriles into cyano-carboxylic acids by *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11216. *Appl Microbiol Biotechnol* 32 : 11-16
- Briglia, M., Y. Nakatsuka, T. Sugai & H. Ohta. 1996. Action of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* IFO 15564 on derivatives of 2,5-anhydro-D-allonitrile. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60(9):1540-1542.
- Cantarella, M. , L. Cantarella, A. Gallifuoco, R. Intellini, O. Kaplan, A. Spera & L. Mart'ynkov'a. 2008. Amidase-catalyzed production of nicotinic acid in batch and continuous stirred membrane reactors. *Enzyme Microb. Technol* 42: 222-229
- Cheong, T. & P. Oriel. 2000. Cloning of a wide spectrum amidase from *Bacillus stearothermophilus* BR 388 in *E. coli* and marked enhancement of amidase expression using directed evolution. *Enzyme Microb Technol* 26:152-158
- Ciskanik, LM. , MW. Jolanta & DF. Robert. 1995. Purification and characterization of an enantioselective amidase from *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Appl Environ Microbiol* 61 : 998-1003
- Dhillon, JK. & N. Shivaraman. 1999. Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species (S1). *Can J. Microbiol* 45: 201-8.
- DiGeronimo, MJ. & AD. Antoine. 1976. Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *Appl Environ Microbiol* 31(6): 900-906.
- Drauz, K. & H. Waldmann. 1995. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis : A Comprehensive Handbook. VCH, Weinheim : 365-367.
- Fitri, EY. 2005. Kinetika fermentasi dan karakteristik enzim yang terlibat dalam proses produksi asam adipat oleh *Pseudomonas* sp [Skripsi].

- Bogor, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB
- Gerhardt, P., RGE. Murray, WA. Wood & NR. Krieg. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. ASM, Washington, D.C.
- Hirrlinger, B., A. Stolz & H. Knackmuss. 1996. Purification and characterization of an amidase from *Rhodococcus erythropolis* MP 50 which enantioselectively hydrolyzes 2-arylpropionamides. *J Bacteriol* 178:3501–3507
- Hughes, J., YC. Armitage & KC. Symes. 1998. Application of whole cell rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74:107-18.
- ICCP. 2001. Climate Change 2001: Synthesis Report. A Contribution of Working Groups I, II, and III to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Watson, R.T. and the Core Writing Team (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, and New York, NY, USA, 398 pp.
- Johnson, DV., AA. Zabelinskaja-Mackova & H. Griengl. 2000. Oxynitrilases for asymmetric C–C bond formation. *Curr Opin Chem Biol* 4: 103–109.
- Kaplan, O., V. Vejvoda, AC. Pisvejcova & L. Martinkova. 2006. Hyperinduction of nitrilases in filamentous fungi. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 33:891-896
- Kobayashi, M., T. Fujiyama & S. Shimizu. 1996. Hyperinduction of nitrile hydratase acting on indole-3-acetonitrile in *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 45:176-181.
- Kobayashi, M., F. Yoshie, G. Masahiko, K. Hidenobu & S. Sakayu. 1997. Identification of active sites in amidase : Evolutionary relationship between amidase bond and peptide bond-cleaving enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 94: 11986-11991
- Komeda, H. & Y. Asano. 2000. Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3. *Eur J Biochem* 267:2028–2035
- Kotlova, E., G. Chestukhina, O. Astaurova, T. Leonova, A. Yanenko & V. Debabov. 1999. Isolation and primary characterization of an amidase from *Rhodococcus rhodochromus* M8. *Biochemistry* 64:384–389
- Layh, N., B. Hirrlinger, A. Stolz & HJ. Knackmuss. 1997. Enrichment strategies for nitrile-hydrolyzing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 668–674.
- Mart'ýnkov'a, L. & V. Mylerov'a. 2003. Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Curr Org Chem* 7: 1279–1295.
- Meyer, O. & HG Schlegel. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Ann Rev Microbiol.* 37: 277-310.
- Moreau, JL., A. Said, A. Alain & G. Pierre. 1993a. Purification and characterization of an adipamidase from a mutant strain of

- Brevibacterium* sp. involved in dinitrile degradation. *Biosci Biotech Biochem* 57: 294-296
- Moreau, J.L., N. Bernet, A. Arnaud & P. Galzy. 1993b. Isolation of *Brevibacterium* sp. R312 mutants potentially useful for the enzymatic production of adipic acid. *Can. J. Microbiol* 39 (2): 207-212
- Munandar, H. 2002. Biokonversi adiponitril menjadi asam adipat secara mikrobiologi [Skripsi]. Bogor, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB
- Nagasawa, T., K. Ryuno & H. Yamada. 1986. Nitrile hydratase of *Brevibacterium* R312: purification and characterization. *Biochem Biophys Res Commun* 139:1305-1312
- Nagasawa, T., H. Nanaba, K. Ryuno, K. Takeuchi & H. Yamada. 1987. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Eur. J. Biochem.* 162: 691-698.
- Nagasawa, T., M. Kobayashi & H. Yamada. 1988. Optimum culture conditions for the production of benzonitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Arch. Microbiol.* 150: 89-94.
- Nawaz, M.S., T.M. Heinze & C.E. Cerniglia. 1992. Metabolism of benzonitrile and butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 27-31.
- Nawaz, M., A. Khan, D. Bhattacharya, P. Sittoneu & C. Cerniglia. 1994. Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading *Rhodococcus* sp. *J Appl Microbiol Biotechnol* 60:3343-3348
- Pereira, R., D. Graham, F. Rainey & D. Cowan. 1998. A novel thermostable nitrile hydratase. *Extremophiles* 2:347-357
- Pfennig, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch Microbiol* 100: 197-206.
- Sander, A. 1991. Charakterisierung Taxonomisch Diverser Nitril-Abbauender Bakterien und Untersuchung der Am Nitrilabbau Beteiligten Enzyme. Doktorarbeit, Universität Bayreuth, Jerman.
- Sugai, T., T. Yamazaki, M. Yokoyama & H. Ohta. 1997. Biocatalysis in organic synthesis: the use of nitrile- and amide-hydrolyzing microorganism. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 61: 1419-1427
- Sunarko, B. 1995. Mikrobieller Abbau von Acetonitril und Vinylacetat und Charakterisierung von Vinylacetatesterase. Dissertation. Universität Bayreuth, Bayreuth
- Sunarko, B., T. U. Harwati, N. Sulistinah, A. Thontowi, A. T. Utari, D. Setianingrum & L. Nurbayani. 2005. Pengembangan dan Aplikasi Metode Penapisan Mikroba Potensial untuk Biokatalis Produksi senyawa Obat Antiinflamasi Non-Steroid (AINS). Laporan Teknis Proyek Penelitian Bioteknologi, Puslit Bioteknologi-LIPI
- Thontowi, A., E.W. Pamuji & B. Sunarko. 2004. Biotransformasi Adiponitril

- oleh *Bacillus licheniformis* BA2. *Berk. Penel. Hayati*: 10 (25–30).
- Wang, MX., J. Liu, DX. Wang & QY. Zheng. 2005. Synthesis of optically active  $\alpha$ -methylamino acids and amides through biocatalytic kinetic resolution of amides. *Tetrahedron: Asymmetry* 16: 2409–2416
- Wu, ZL. and ZY. Li. 2002. Enhancement of enzyme activity and enantioselectivity via. Cultivation in nitrile metabolism by *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497. *Biotechnol. Appl. Biochem* 35:61-67
- Wyatt, JM. & EA. Linton. 1988. The industrial potential of microbial nitrile biochemistry. Dalam Mehnert, J., L. Brimer (eds.), *Cyanide Compounds in Biology*, John Wiley & Sons, Chichester, 32-42
- Yamada, H. & M. Kobayashi. 1996. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 : 1391-1400